

Caractérisation de déversoirs d'orage basée sur le métabolisme algal

Characterization of combined sewer overflows based on algal metabolism

Gaspard Hubert¹, Céline Chouteau¹, Yannis Ferro² and Claude Durrieu²

¹ CETE Nord-Picardie, Site de Saint-Quentin, 151 rue de Paris 02100 Saint-Quentin, France surname.name@developpement-durable.gouv.fr

² Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, ENTPE rue Maurice Audin 69518 Vaulx-en-Velin Cedex name@entpe.fr

RÉSUMÉ

La reconquête de la qualité des milieux aquatiques passe par une maîtrise des rejets polluants notamment les Rejets Urbains de Temps de Pluie (RUTP).

Il semble intéressant de pouvoir disposer d'essais rapides de caractérisation de ces rejets pour pouvoir identifier et hiérarchiser les ouvrages présentant un risque pour le milieu récepteur.

Les bioessais basés sur le métabolisme algal répondent à des familles de polluants spécifiques. La présente étude montre qu'il est possible de discriminer deux déversoirs d'orage dont les rejets ont une qualité chimique différente sans réaliser de screening physico-chimique complet. Les bioessais basés sur des activités métaboliques de *Chlorella vulgaris* apparaissent particulièrement intéressants pour caractériser des mélanges complexes dont la composition n'est pas connue et/ou qui peut varier dans le temps.

ABSTRACT

Aquatic ecosystem restoration requires an improved control of pollutant outputs, in particular CSOs.

It seems interesting to use rapid assays to characterize these outputs and then, identify and prioritize facilities that present a potential risk for the aquatic ecosystem.

Bioassays based on algal metabolism can answer to specific pollutant families. The present study shows that it is possible to discriminate two sewer combined overflows with different chemical qualities without a complete chemical screening. Bioassays based on *Chlorella vulgaris* metabolic activities appear to be particularly interesting since they can help to characterize complex mixtures with unknown composition and/or changing composition over time.

MOTS CLES

Activités métaboliques, Bioessais, Déversoirs d'orage, Impacts

1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau, il est nécessaire de pouvoir proposer aux gestionnaires des outils leur permettant de caractériser la qualité des rejets de leur réseau d'assainissement.

Les réseaux d'assainissement complexes possèdent de nombreux points de rejets vers le milieu naturel récepteur, ce qui peut générer des pollutions. La lutte contre la pollution causée par les rejets urbains de temps de pluie peut notamment conduire à la réalisation de travaux sur le réseau et la création d'ouvrages de pré-traitement. Toutefois, afin d'optimiser la mise en œuvre de telles mesures d'un point de vue technique et financier, il apparaît nécessaire de pouvoir identifier, au préalable, les rejets urbains de temps de pluie présentant un risque pour les écosystèmes.

L'utilisation des bioessais basés sur le métabolisme algal présente un certain nombre d'avantages :

- une réponse obtenue en utilisant des cellules entières (c'est à dire la culture d'algues sans dénaturation) d'un organisme représentatif de la base des systèmes trophiques aquatiques,
- un résultat rapide,
- une réponse à un mélange de composition variée intégrant la biodisponibilité des polluants, les effets synergiques ou antagonistes des différents constituants. Cette réponse reste toutefois qualitative.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'intérêt de bioessais basés sur le métabolisme algal pour hiérarchiser les déversoirs d'orage (DO) les plus problématiques d'un réseau d'assainissement.

2 MISE EN ŒUVRE DE L'EXPERIMENTATION

2.1 Sites d'études

Les DO sélectionnés pour cette étude ont été choisis selon plusieurs critères : l'accessibilité du rejet, le type de réseau (unitaire, séparatif) ou encore l'environnement (occupation du sol, urbanisation,...).

Deux DO localisés dans des environnements et sur des portions de réseau d'assainissement différents ont été retenus.

Le premier DO est localisé sur un réseau séparatif situé dans une zone péri-urbaine, près d'un parc et d'industries. Le rejet se fait dans un lac artificialisé qui sert de plan d'eau pour des activités de loisirs variées.

Le deuxième DO est localisé sur un réseau unitaire situé dans une zone urbaine, avec quelques parcs et beaucoup de sites industriels surveillés situés à proximité émettant potentiellement des pollutions métalliques et organiques (textils, mécanicien automobile, construction et station essence). Le rejet en cas de surverse se fait dans un canal (canal de Roubaix).

2.2 Prélèvements *in situ*

Des prélèvements d'eau au niveau des déversoirs d'orage ont donc été effectués mensuellement en vue :

- du bilan physico-chimique,
- des essais sur phosphatase alcaline et estérase.

Ces prélèvements ont été réalisés ponctuellement au cours de la journée (le matin pour le DO séparatif et le début d'après-midi pour le DO unitaire). Les conditions météo étaient variables selon les mois. Cinq échantillonnages ont été établis dans un contexte de temps de pluie, quatre dans un contexte de temps sec. Un échantillon conservatoire est stocké à une température de -4°C.

2.3 Bilan physico-chimique

Les analyses suivantes ont été réalisées sur les échantillons d'eau afin de réaliser un screening global: phosphore total, indice hydrocarbures C10-C40, matières en suspension totales MEST, DBO₅, DCO, azote Kjédahl, ammonium, nitrates, orthophosphates, azote nitrique, nitrites, azote nitreux, cadmium, chrome, cuivre, plomb, zinc.

2.4 Mesures d'activités métaboliques sur *Chlorella vulgaris*

2.4.1 Cultures d'algues *Chlorella vulgaris*

Les algues *Chlorella vulgaris* sont cultivées dans des milieux préparés selon la norme AFNOR T90-304 [1]. Ces milieux permettent de combler tous les besoins nutritionnels nécessaires à la croissance de l'algue. Les cultures sont renouvelées tout au long de l'année à l'aide de repiquages réguliers (fréquence : tous les 10-15 jours).

Afin d'obtenir une activité phosphatase alcaline maximale, il est nécessaire que les algues épuisent tout leur phosphore interne. Les algues en milieu AFNOR sont donc repiquées en phase exponentielle de croissance dans un milieu AFNOR sans phosphate. Cette étape se nomme starvation et dure 21 jours [2].

Le repiquage des algues est effectué en conditions stériles à l'aide d'une hotte à flux laminaire et d'un bec bunsen. Les algues sont ensuite placées sous agitation dans une pièce sombre, climatisée à 20°C sous un éclairage d'intensité lumineuse fixée à 5000 lux.

2.4.2 Prétraitement des échantillons

Une partie de chaque échantillon des RUTP collectés est filtrée à l'aide d'un système de filtration sous vide. Le papier filtre utilisé est de la marque Whatman (Cat No 1442 070), d'un diamètre de 70 mm et d'une porosité de 2,5µm. Il est adapté pour retenir une grande partie des matières en suspension. Une autre partie n'est pas filtrée. Tous les échantillons sont ensuite passés à l'autoclave pendant 2 heures, à une température de 120°C afin de les stériliser.

L'échantillon conservatoire est mis au congélateur à une température de -4°C. Les échantillons filtré-autoclavés et les échantillons uniquement autoclavés sont, quant à eux, conservés au réfrigérateur pendant une période de deux mois. Ces deux échantillons permettront de distinguer l'effet du mélange filtré (phase soluble) et l'effet du mélange brut (soluble+particulaire).

2.4.3 Exposition des algues aux RUTP

L'exposition des algues aux échantillons de RUTP a été fixée à 2 heures. En effet, des essais préliminaires effectués dans notre laboratoire avec des durées d'exposition de 4 h et 24 h ont confirmé les tendances visibles à 2h.

La centrifugation des algues est utilisée afin de travailler sur le matériel algal exposé aux mélanges en évitant les fluorescences parasites que les rejets pourraient émettre.

2.4.4 Mesures de l'activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une enzyme dont l'activité diminue en présence de métaux lourds [3,4]. On s'intéresse ici à l'activité de la phosphatase alcaline membranaire de *Chlorella vulgaris*.

La réaction suivie dans le cadre de cette étude est présentée sur la **figure 1**.

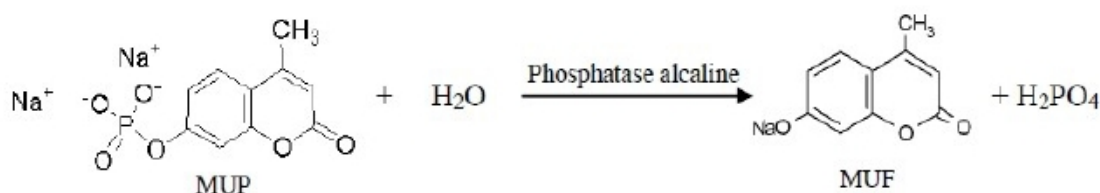


Figure 1: Schéma de la réaction catalysée par la phosphatase alcaline

La méthyl-umbelliféryl-phosphate (MUP) est le substrat nécessaire à l'algue pour que la phosphatase algale la dégrade et forme de la Méthyl-umbelliférone (MUF), un produit qui fluoresce selon un couple d'excitation-émission de 355nm-460nm. L'activité de l'enzyme est donc proportionnelle à l'intensité de la fluorescence détectée.

La mesure de la fluorescence s'effectue à l'aide d'un spectrofluorimètre TECAN infinite pro 200. Les mesures sont réalisées en micro-plaques noires Brand de 96 puits de 300µL. Le temps de mesure a été fixé à 10 minutes de temps de contact algues-substrat (une mesure à t=0, à t=5 minutes, à t=10 minutes). Des temps de contact plus longs (20 et 30 minutes) ont permis d'observer les mêmes tendances qu'à 10 minutes. Le protocole est récapitulé sur le **tableau 1** avec l'ensemble des réactifs utilisés. La différence de concentration entre les solutions d'algues utilisées n'a pas permis de mettre en évidence un effet de la concentration sur les résultats obtenus.

Tableau 1 : Protocole de mesure de l'activité phosphatase alcaline

	Volumes utilisés	Concentrations finales
Tampon TRIS	30 μ L	TRIS-HCl (1M, pH à 8,5) 10 mM
Eau pure	90 à 190 μ L	-
Algues	80 μ L	Entre $1 \cdot 10^7$ et $5 \cdot 10^7$ cellule/mL
Substrat (MUP)	0 à 100 μ L	Entre 0 et 20 μ M

2.4.5 Mesures de l'activité estérase

Les estérases sont des enzymes dont l'activité est modifiée en présence de certains types d'insecticides, notamment les organophosphorés ou les carbamates [3,4].

Le mécanisme d'action de ces insecticides est lié à leur ressemblance avec des substrats naturels. Les molécules telles que les organophosphorés et les carbamates entrent en compétition avec le substrat et modifient l'activité de l'enzyme [5].

Les mesures sont réalisées avec le même matériel que pour l'activité phosphatase alcaline.

Le substrat utilisé est la fluorescéine diacétate (FDA). L'hydrolyse de cette molécule par les estérases conduit à la formation de la fluorescéine, une molécule qui fluoresce selon un couple excitation-émission de 480nm-538nm. Le protocole est récapitulé dans le **tableau 2**. Le temps de contact est le même que pour la phosphatase alcaline, c'est à dire 10 minutes, et la différence de concentration entre les solutions d'algues utilisées n'a pas mis en évidence de différence dans les résultats obtenus.

Tableau 2 : Protocole de mesure de l'activité estérase

	Volumes utilisés	Concentrations finales
Tampon Citrate (0,1M, pH 5,4)	30 μ L	10mM
Solution algale	80 μ L	$1 \cdot 10^7$ à $5 \cdot 10^7$ algues/mL
FDA	0 à 100 μ L	0 à 3,51 μ M
Eau pure	90 μ L à 190 μ L	-

2.4.6 Exploitation des résultats

Les données brutes récoltées à l'aide du spectrofluorimètre permettent de comparer les activités et les cinétiques enzymatiques de la solution algale témoin (algues+eau pure), celles des algues exposées au mélange brut (DO autoclavé) et celles des algues exposées au mélange filtré (DO filtré-autoclavé). La comparaison de ces activités est présentée à 10 minutes de temps de contact algues-substrat et les cinétiques sont calculées entre 0 minute et 5 minutes de temps de contact.

La comparaison d'activité permet de calculer l'activité enzymatique résiduelle¹. Cet indice matérialise mathématiquement la diminution ou la stimulation des activités enzymatiques.

Les courbes représentatives des cinétiques enzymatiques fournissent, par une linéarisation de Hanes ou de Lineweaver-Burke, les paramètres cinétiques que sont le K_m , la V_m et le K_m/V_m .

Le K_m est la concentration de substrat pour laquelle on atteint la moitié de la vitesse maximale de réaction. Il représente le degré d'affinité de l'enzyme pour son substrat. Il est exprimé en μ M et est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme.

La V_m est la vitesse maximale de réaction. C'est la représentation du degré de saturation de l'enzyme étudiée. Elle est exprimée en μ M/minute.

Le K_m/V_m résume l'efficacité globale de l'enzyme. Il établit le nombre de minutes, dans les conditions optimales de réaction, nécessaires à l'enzyme pour dégrader la totalité du substrat fourni.

Par convention, sur les diagrammes et les cinétiques, le gris clair se réfère au témoin, le noir aux algues exposées au mélange autoclavé et le gris intermédiaire aux algues exposées au mélange filtré-autoclavé.

¹ L'activité résiduelle est calculée de la manière suivante:

$$\text{ActRésid} = 100 - 100(\text{ActTémoin} - \text{Act Echantillon}) / \text{ActTémoin}$$

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Caractérisation des rejets du DO unitaire (suivi janvier 2012-septembre 2012)

Le **tableau 3** rend compte des valeurs mesurées pour les paramètres étudiés au cours de l'année de suivi. On remarque que de nombreux paramètres dépassent les valeurs préconisées par la DCE et par la norme NQE, notamment pour le phosphore total, les MEST, la DBO₅, la DCO, l'Azote Kjeldahl et les métaux lourds comme le Cuivre et le Zinc.

Deux campagnes se dégagent en avril et en mai. En avril 2012, on constate un dépassement uniquement sur le cuivre et le zinc et en mai 2012, un dépassement assez important pour quatre des cinq métaux lourds suivis au cours de cette étude (chrome, cuivre, plomb et zinc).

Tableau 3 : Bilan physico-chimique effectué sur l'eau brute entre janvier et septembre 2012 pour le DO unitaire (les valeurs grisées sont celles dépassant le seul NQE ou DCE).

		10/01/12	07/02/12	12/03/12	11/04/12	09/05/12	14/06/12	11/07/12	16/08/12	18/09/12	Seuils NQE	Seuils DCE
Phosphore total	mgP/L	9,40	5,30	3,70	0,15	1,40	4,80	5,10	6,60	6,60		0,2
Indice hydrocarbures	mg/l	0,7	1,0	1,0	<0,1	0,20	1,40	1,30	0,60	2,80		
MEST	mg/L	334	113,0	94,0	6,4	29,00	50,00	44,00	68,00	101,00		50
DBO	mg/L	290	140,0	110,0	1,7	20,00	120,00	220,00	120,00	150,00		6
DCO	mg/L	709	485,0	295,0	<20	80,00	302,00	403,00	388,00	495,00		30
Azote Kjeldahl	mgN/L	68,1	60,2	32,8	1,1	12,60	50,40	53,60	61,00	73,90		2
Ammonium	mg/L NH4+	63	60,00	29,00	0,38	7,80	0,89	0,58	70,00	87,00		
Nitrates	mg/L NO3-	<1,0	<1	<0,5	<0,5	12,50	<0,5	<0,5	<1,0	<0,5		50
Orthophosphates	mg/L PO4	18	11,0	4,4	0,18	2,90	12,00	13,00	15,00	18,00		
Azote nitrique	mgN/L	<0,23	<0,23	<0,11	<0,11	2,82	<0,11	<0,11	<0,23	<0,11		
Nitrites	mg/L NO2-	0,03	<0,02	<0,02	0,04	0,03	<0,02	0,030	<0,02	0,04		0,3
Azote nitreux	mg/L NH4+	0,009	<0,006	<0,006	0,012	0,009	<0,006	0,009	<0,006	0,012		
Cadmium	mg/L	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	0,0015	
Chrome	mg/L	0,003	0,003	0,003	0,003	0,010	0,002	<0,002	<0,002	0,002	0,0034	
Cuivre	mg/L	0,007	0,008	0,007	0,008	0,012	0,013	0,014	0,008	0,014	0,0014	
Plomb	mg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,023	<0,005	<0,005	<0,002	0,005	0,0072	
Zinc	mg/L	0,101	0,067	0,045	0,040	0,796	0,080	0,088	0,075	0,087	0,0031	

Cet article rendra compte des résultats obtenus sur les deux essais (phosphatase alcaline et estérase) pour la campagne du 14 juin 2012. Cette date a été choisie de manière arbitraire. Elle permettait de rendre compte des tendances générales les plus visibles au cours de l'année pour les deux DO échantillonnés ainsi que pour les deux tests effectués.

3.1.1 Effets sur l'activité phosphatase alcaline

La **figure 2** présente les résultats obtenus pour le **DO unitaire** de la campagne d'échantillonnage de **juin 2012** (temps de pluie). La couleur la plus sombre se réfère aux activités enzymatiques après exposition au DO autoclavé, l'intermédiaire au DO filtré, la plus claire au témoin. Ce code couleur sera conservé jusqu'à la fin.

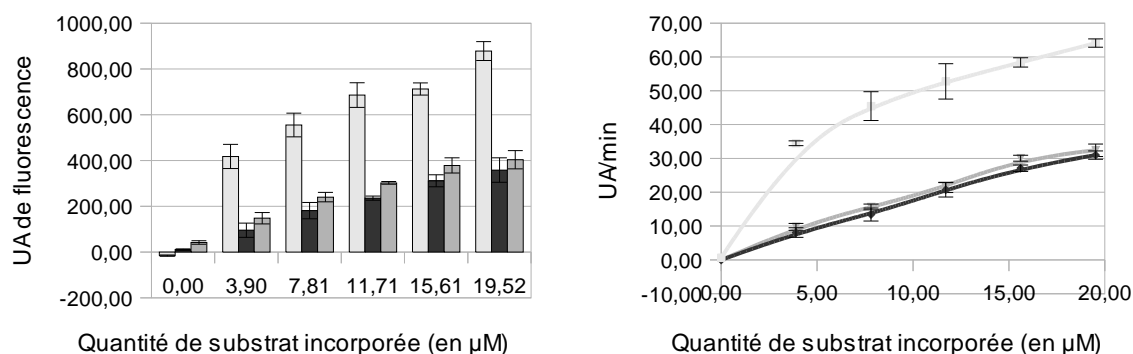


Figure 2 : Évolution de la fluorescence liée aux activités phosphatase alcaline en fonction de la quantité de substrat incorporée avec les activités comparées (à gauche) et les cinétiques comparées (à droite)

Les activités phosphatase alcaline (APA) du témoin sont plus importantes pour toutes les concentrations de substrat. Si l'on se réfère aux écart-types, ces différences sont significatives. On remarque aussi que l'impact du mélange brut est plus grand que celui du mélange filtré, mais l'écart n'est pas significatif pour toutes les concentrations de substrat. Le **tableau 4** présente les activités résiduelles de chaque essai selon la concentration de substrat.

Tableau 4 : Activités résiduelles des APA pour le test du DO unitaire de juin 2012 (T=témoin, DOA=DO autoclavé, DOF+A : DO filtré-autoclavé ; les pourcentages grisés représentent une diminution d'activité)

MUP(μ M)	DOA/T (%)	DOF+A/T (%)	DOF+A/DOA(%)
0,00			
3,90	22,90	35,41	154,65
7,81	32,58	43,24	132,73
11,71	34,35	44,05	128,23
15,61	43,69	53,08	121,50
19,52	40,79	45,93	112,59

Les cinétiques comparées confirment les résultats visibles sur les activités comparées. Elles permettent de calculer les paramètres cinétiques présentés au **tableau 5**.

Tableau 5 : Paramètres cinétiques calculés pour l'essai du DO unitaire de juin 2012

	APA-T	APA-DOA	APA-DOF+A
Km(μ M)	4,908	47,593	28,909
Vm(μ M/min)	0,010	0,013	0,010
Km/Vm(min)	490,80	3661,00	2890,90
R2	0,988	0,994	0,992

Ces paramètres montrent que la performance globale de l'enzyme (exprimée par Km/Vm) est grandement affectée par l'exposition aux mélanges. En effet, la performance du témoin est de 490 minutes alors que la performance des solutions d'algues exposées sont de 3661 minutes et 2890 minutes. Cette performance diminuée est surtout expliquée par une forte altération de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (exprimée par le Km).

3.1.2 Effets sur l'activité estérase

La **figure 3** montre les résultats obtenus pour le **DO unitaire** de la campagne d'échantillonnage de **juin 2012** (temps de pluie).

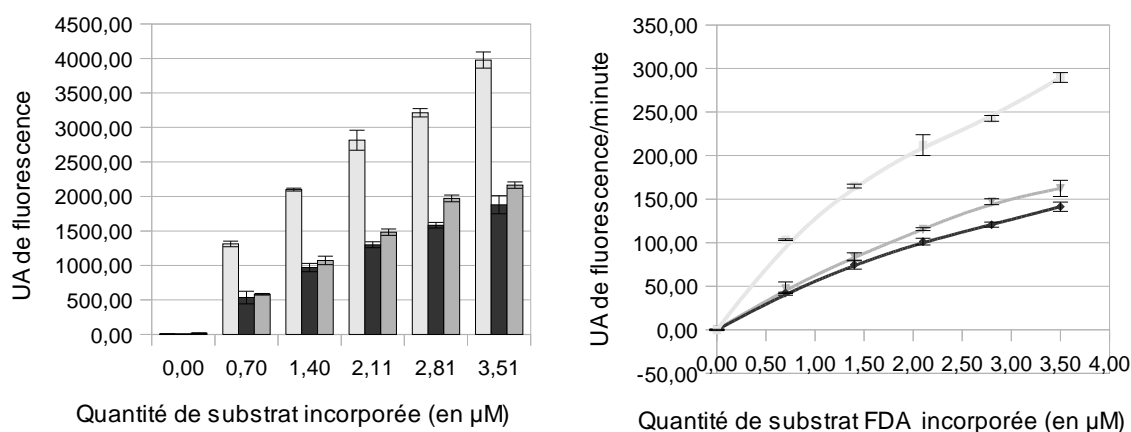


Figure 3 : Évolution de la fluorescence liée aux activités estérase en fonction de la quantité de substrat incorporée avec les activités comparées (à gauche) et les cinétiques comparées (à droite)

Les activités estérases (AE) du témoin sont plus importantes que les AE des deux solutions d'algues exposées au mélange tout le long du gradient de concentration du substrat. Si l'on se réfère aux écart-types, les différences semblent significatives. L'impact du mélange brut est de nouveau plus important que l'impact du mélange filtré. Le **tableau 6** des activités résiduelles reprend les diminutions d'activité observées sur les activités comparées.

Tableau 6 : Activités résiduelles des activités estérases pour le test du DO unitaire de juin 2012 (les pourcentages grisés représentent une diminution d'activité)

FDA(μM)	DOA/T(%)	DOF+A/T(%)	DOF+A/DOA(%)
0,00			
0,70	40,81	44,35	108,67
1,40	46,19	51,08	110,59
2,11	46,19	52,67	114,02
2,81	49,25	61,38	124,63
3,51	47,27	54,44	115,15

Les cinétiques confirment l'inhibition observée avec les activités comparées. La vitesse maximale de saturation n'est pas atteinte avec ce gradient de concentration mais les différences entre les trois activités restent notables. Les paramètres cinétiques calculés sont présentés dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Paramètres cinétiques calculés pour le test du DO unitaire de juin 2012

	AE-T	AE-DOA	AE-DOF+A
Km(μM)	2,390	5,400	6,775
Vm(μM/min)	0,011	0,008	0,011
Km/Vm(min)	254,64	675,00	615,91
R2	0,972	0,979	0,954

Les deux solutions d'algues exposées ont une AE dont la performance globale est moins importante (675,00 min et 615,91 min) que celle du témoin (254,64 min). Cette différence est plus influencée par une perte d'affinité de l'enzyme pour son substrat. En effet, le Km est nettement plus grand pour les deux solutions d'algues exposées que pour le témoin. La vitesse catalytique suite à l'exposition au DO autoclavé est, quant à elle, affectée, mais elle explique moins la diminution de performance.

3.2 Caractérisation des rejets du DO 5 (suivi janvier 2012-septembre 2012)

Le **tableau 8** rend compte des valeurs mesurées pour les paramètres étudiés au cours de l'année de suivi. Une grande partie des campagnes a révélé des valeurs qui ne dépassaient pas les seuils préconisés. La DCO, le cuivre et le zinc restent des paramètres problématiques au regard des seuils. Le phosphore total, à partir d'avril 2012, a systématiquement dépassé le seuil.

Tableau 8 : Bilan physico-chimique effectué sur l'eau brute de janvier à septembre 2012 du DO séparatif (les valeurs grisées sont celles dépassant le seul NQE ou DCE).

		10/01/12	07/02/12	12/03/12	11/04/12	09/05/12	14/06/12	11/07/12	16/08/12	18/09/12	Seuils NQE	Seuils DCE
Phosphore total	mgP/L	0,18	0,15	0,18	0,35	0,32	0,34	0,46	0,28	0,57		0,2
Indice hydrocarbures	mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,4	<0,1	<0,1	<0,1	0,20		
MEST	mg/L	7,1	18,0	4,8	29,0	74	3	7,2	4,00	37,00		50
DBO	mg/L	<0,5	0,7	1,5	7,0	2	1,2	1,9	3,00	8,00		6
DCO	mg/L	35,0	71,0	<20	61,0	83	24	36	48,00	61,00		30
Azote Kjeldahl	mgN/L	<1	1,1	<1,0	1,8	1,7	1,3	1,6	2,10	3,00		2
Ammonium	mg/L NH4+	0,06	<0,05	<0,05	0,57	0,2	0,2	0,91	0,90	2,30		
Nitrates	mg/L NO3-	1,0	<1	7,4	1,4	1,3	0,9	<0,5	1,10	<0,5		50
Orthophosphates	mg/L PO4	0,47	0,3	0,5	0,59	0,36	0,68	0,82	0,60	1,50		
Acide nitrique	mgN/L	0,23	<0,23	1,67	0,3	0,29	0,2	<0,11	0,25	<0,11		
Nitrites	mg/L NO2-	<0,02	<0,02	0,03	0,22	0,21	0,39	<0,02	0,99	<0,02		0,3
Acide Nitreux	mg/L NH4+	<0,006	<0,006	0,009	0,067	0,064	0,119	<0,006	0,30	<0,006		
Cadmium	mg/L	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	0,002	
Chrome	mg/L	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	0,002	<0,002	0,004	<0,002	<0,002	0,0034	
Cuivre	mg/L	<0,002	0,005	0,004	0,015	0,020	0,006	0,011	0,011	0,013	0,0014	
Plomb	mg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,005	0,0072	
Zinc	mg/L	0,078	0,058	0,033	0,074	0,061	0,035	0,069	0,060	0,071	0,0031	

3.2.1 Effets sur l'activité phosphatase alcaline

La **figure 4** présente les résultats pour le **DO séparatif** de la campagne de juin 2012 (temps de pluie). Les APA du témoin sont plus importantes pour toute la gamme de concentration du substrat. Les écart-types montrent que cette différence est significative. L'impact du mélange brut est comparable avec celui du mélange filtré mise à part pour la plus petite concentration de substrat. Le **tableau 9** présente les activités résiduelles du test APA pour le **DO séparatif** de juin 2012.

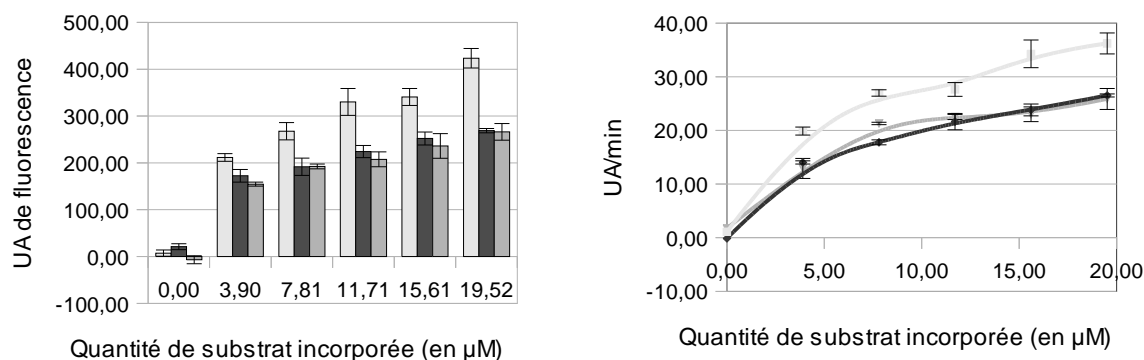


Figure 4 : Évolution de la fluorescence liée aux activités phosphatase alcaline en fonction de la quantité de substrat incorporée avec les activités comparées (à gauche) et les cinétiques comparées (à droite)

Tableau 9 : Activités résiduelles des APA pour le test du DO séparatif de juin 2012 (les pourcentages grisés représentent une diminution d'activité)

MUP(µM)	DOA/T(%)	DOF+A/T(%)	DOF+A/DOA(%)
0,00			
3,90	81,57	73,08	89,59
7,81	71,71	72,00	100,41
11,71	67,96	62,92	92,59
15,61	74,01	69,32	93,66
19,52	63,50	62,89	99,04

Les cinétiques comparées confirment l'inhibition observée et les paramètres cinétiques qui en découlent sont présentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Paramètres cinétiques du test du DO séparatif de juin 2012.

	APA-T	APA-DOA	APA-DOF+A
Km(µM)	5,176	5,121	5,014
Vm(µM/min)	0,003	0,002	0,002
Km/Vm(min)	1725,33	2560,50	2507,00
R2	0,969	0,990	0,983

Les paramètres cinétiques montrent une performance globale de l'enzyme similaire entre les deux solutions d'algues qui sont exposées à un des mélanges (2560,50 min pour le mélange autoclavé et 2507,00 pour le mélange filtré-autoclavé). Cette performance est en revanche moins importante que celle du témoin (1725,33 min).

Cette diminution de performance est surtout imputable à une baisse de la vitesse catalytique (Vm). Elle est de 0,002 µM/min pour les deux solutions d'algues exposées alors qu'elle est de 0,003 µM/min pour le témoin. Les affinités des enzymes pour le substrat sont peu affectées.

3.2.2 Effets sur l'activité estérase

La **figure 5** présente les résultats pour le DO séparatif de la campagne de **juin 2012** (temps de pluie). L'AE de la solution d'algues exposée à la phase filtrée induit une plus grande activité enzymatique par rapport au témoin, mais la différence ne semble pas significative sauf pour les plus grandes concentrations de substrat. L'AE de la solution exposée au mélange autoclavé est quant à elle comparable à l'AE du témoin. Les activités résiduelles (**tableau 11**) montrent bien une stimulation suite à l'exposition avec la phase filtrée sur l'ensemble du gradient, exception faite de la plus petite quantité de substrat incorporée. Les plus grandes quantités de substrat incorporées induisent une plus grande efficacité des estérases exposées à la phase filtrée de l'échantillon. Cette tendance est confirmée par les cinétiques enzymatiques.

Les linéarisations des données issues des cinétiques enzymatiques conduisent au **tableau 12** présentant les paramètres cinétiques.

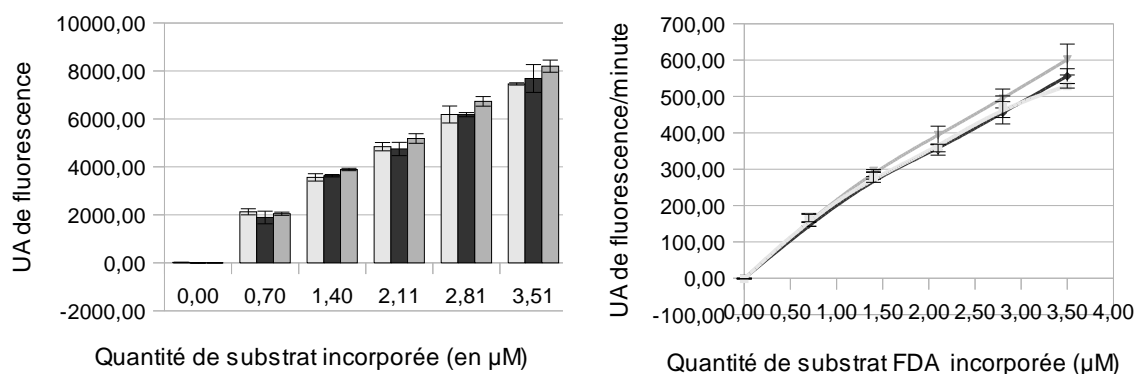


Figure 5 : Évolution des activités estérases en fonction de la quantité de substrat incorporée avec les activités comparées (gauche) et les cinétiques comparées (droite)

Tableau 11 : Activités résiduelles des AE pour le test du DO séparatif de juin 2012 (les pourcentages grisés représentent une diminution d'activité)

FDA(µM)	DOA/T(%)	DOF+A/T(%)	DOF+A/DOA(%)
0,00			
0,70	88,8	96,12	108,24
1,40	102,01	109,29	107,14
2,11	98,01	107,02	109,19
2,81	99,91	108,86	108,96
3,51	103,06	109,92	106,66

Tableau 12 : Paramètres cinétiques des AE du test du DO séparatif de juin 2012.

	AE-T	AE-DOA	AE-DOF+A
Km(µM)	4,006	7,488	7,126
Vm(µM/min)	0,016	0,022	0,023
Km/Vm(min)	300,44	340,36	309,83
R2	0,947	0,876	0,958

La performance globale de l'enzyme est plus importante pour le témoin (300 min) que pour les deux solutions d'algues exposées (340 min et 309 min), cependant les écarts sont assez limités. Les Km des deux solutions exposées sont altérés de la même manière puisque l'affinité de l'enzyme pour le substrat semble amoindrie dans les mêmes proportions (7,488 µM et 7,126µM contre 4,006µM). Les Vm mesurées révèlent des valeurs plus importantes que pour le témoin (0,023 µM/min et 0,022 µM/min contre 0,016µM/min).

3.3 Discussion

Les bilans physico-chimiques (**tableaux 3 et 8**) reflètent bien la différence de nature entre les deux déversoirs d'orage (l'un unitaire en zone urbaine, l'autre séparatif en zone péri-urbaine).

Les essais sur phosphatase (**figures 2 et 4**) ont montré pour les deux tests une inhibition des activités suite à l'exposition au mélange brut et au mélange filtré. Cependant, la diminution d'activité est moindre suite à l'exposition aux mélanges issus du réseau séparatif (**tableaux 4 et 8**). Si l'on se réfère à la charge en métaux lourds, cette différence confirme bien les tests en laboratoire qui montraient une diminution de l'APA en présence de ces métaux lourds [3,4]. Cependant des travaux [4] ont montré que les orthophosphates induisaient aussi une diminution des APA. La forte présence d'orthophosphates dans le bilan physico-chimique du DO issu du réseau unitaire (**tableau 3**) pourrait aussi expliquer cette diminution plus importante.

Les essais sur les activités estérases (**figures 3 et 5**) ont permis de discriminer de manière plus nette les deux DO. En effet, l'exposition aux mélanges issus du DO unitaire ont induit une diminution significative de l'AE (**tableau 6**), chose qui n'a pas été observée pour le DO séparatif (**tableau 11**). Cet essai semble donc un bon moyen de distinguer des DO dont les rejets ont des natures et des qualités physico-chimiques potentiellement différentes.

L'analyse des paramètres cinétiques confirme la diminution de performance globale de l'enzyme dans

le cas des inhibitions (**tableaux 5, 7, 10**). En revanche, le **tableau 12** montre une enzyme relativement moins performante pour le test estérase du DO séparatif alors que les activités et cinétiques comparées suggéraient le contraire (**figure 5**). Il apparaît que l'approximation générée par les linéarisations peut conduire à des paramètres cinétiques difficilement interprétables. Différencier les deux DO à l'aide des paramètres cinétiques peut donc s'avérer problématique.

4 CONCLUSIONS-PERSPECTIVES DE TRAVAIL

4.1 Intérêt des bioessais basés sur le métabolisme algal pour caractériser les RUTP

L'objectif de l'étude est de pouvoir, à terme, proposer aux gestionnaires des outils leur permettant de caractériser rapidement et à moindre coût la qualité des rejets de leur réseau d'assainissement. Les bioessais basés sur le métabolisme de *Chlorella vulgaris* sont des outils dont le potentiel est certain pour atteindre cet objectif. En effet, ce bioessai possède des avantages *à priori* dans la discrimination des différents types de pollution, notamment métalliques, phosphatées et hydrocarbonnées (pesticides). Cette potentialité et la rapidité de la réponse fournie constitueraient un outil d'alarme précoce pour les gestionnaires.

Cet essai pourrait être utilisé sur les pollutions susceptibles d'intervenir tout au long du réseau et plus particulièrement lors des rejets dans les milieux récepteurs. De plus, il ciblerait la nature de la pollution et orienterait la recherche vers les substances incriminées, ce qui limiterait le coût en analyses chimiques. Cet avantage est particulièrement intéressant pour le suivi des pollutions liées aux pesticides, au regard du coût élevé de ce genre d'analyses.

Les gestionnaires, à l'aide de cette alarme précoce (un à deux jours entre le prélèvement et la réponse), auraient la possibilité de hiérarchiser les points les plus problématiques de leur réseau. Ainsi, les ouvrages dont les rejets induisent les diminutions d'activité les plus importantes seraient les ouvrages qui pourraient être considérés comme prioritaires dans leur gestion. Une évaluation à grande échelle des impacts des RUTP serait alors envisageable. Ceci permettrait une gestion optimisée des moyens attribués à la qualité des eaux de rejets et des eaux de pluies en zone urbaine.

4.2 Perspectives de travail

L'influence cumulée des orthophosphates et des métaux lourds sur la phosphatase alcaline pose la question de la sélectivité de l'enzyme. Cette sélectivité est importante pour cibler précisément la nature des pollutions engendrées. Ce champ d'étude fera l'objet d'une attention particulière lors de l'année 2013. Les essais sur les estérases ont donné des résultats satisfaisants et conformes aux résultats aperçus dans la bibliographie avec des solutions synthétiques de pesticides. Cette piste est donc prometteuse.

La discrimination des DO à l'aide des paramètres cinétiques n'a pas abouti à des résultats concluants lors de cette année de suivi. L'analyse de ce type de données nécessite une seconde année d'évaluation. Par ailleurs, la comparaison entre la phase filtrée et le mélange autoclavé n'ayant pas induit de grande différence avec un filtre à 2,5 µm, un filtrage à 0,45µm sera testé pour évaluer la diminution d'activité enzymatique induite par cette phase.

L'un des principaux champs d'étude de l'année 2013 sera le traitement statistique des données issues des bilans physico-chimiques des DO. La mise en évidence des paramètres qui perturbent le plus les activités enzymatiques permettra d'évaluer la sensibilité et la robustesse des bioessais.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Norme AFNOR T 90-304, 1983, formation milieu LC oligo.
- [2] Durrieu C., Tran-Minh C., *Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals*, 2003 Ecotoxicology and Environmental Safety 51, p.206-209.
- [3] Chouteau C. *Développement d'un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales*, 2004, Ecole doctorale chimie de Lyon, p.63,65.
- [4] Guédri H. *Mise au point d'un biocapteur basé sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques*, 2011. Ecole doctorale chimie de Lyon, p.155.
- [5] Nistor C. and Emneus J. *Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants*. Waste Management, 1999, Vol. 19, pp. 147-170.